

5

Способ лечения заболеваний,  
 сопровождающихся изменениями качественного и/или количественного  
 10 состава внеклеточной ДНК крови

#### Область техники

Изобретение относится к медицине и ветеринарии и может быть  
 15 использовано для лечения заболеваний, сопровождающихся качественными  
 или количественными изменениями внеклеточной ДНК крови, а именно:  
 генерализованных инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями,  
 заболеваний, вызываемых грибами и простейшими, атеросклероза, сахарного  
 диабета, аллергических заболеваний, связанных с реакцией  
 20 гиперчувствительности замедленного типа, а также заболеваний,  
 обусловленных мутациями генов соматических клеток.

#### Предшествующий уровень техники

25 Перечисленные заболевания согласно современным знаниям  
 представляют собой крайне неоднородные и различающиеся между собой по  
 этиологии и патогенезу болезненные процессы. В соответствии с этими  
 представлениями и лечение этих заболеваний осуществлялось совершенно  
 различными методами. Так, основным способом лечения заболеваний,

вызываемых бактериями, грибами и простейшими, является антибиотико и химиотерапия, см. Merck Manual of Diagnosis and Therapy; 16<sup>th</sup> Edition.

Основным способом лекарственного лечения атеросклероза является терапия препаратами группы статинов, подавляющих синтез холестерина в  
5 организме, см. New Concepts and Paradigms in Cardiovascular Medicine: The Noninvasive Management of Coronary Artery Disease, K. Lance Gould, THE AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE, Volume 104, June 22, 1998, 2s-17s.

В основе лекарственного лечения сахарного диабета лежат три основных подхода – заместительная терапия препаратами инсулина, лекарственная  
10 терапия, направленная на улучшение секреции инсулина поджелудочной железой, лекарственная терапия, направленная на повышение чувствительности тканей к инсулину или ускорение утилизации тканями глюкозы, см. Pharmacological Management of Diabetes: Recent Progress and Future Perspective in Daily Drug Treatment, Gérard Emilien et.al., Pharmacol. Ther.  
15 Vol. 81, No. 1, pp. 37–51, 1999.

В основе терапии аллергических заболеваний, связанных с реакциями гиперчувствительности IV типа лежит иммуносупрессивная или иммуномодулирующая терапия, см. Therapeutic Immunosuppression,  
ed.A.W.Thomson, Ser.Immunology and Medicine vol.29, Kluwer Acad.Publishers,  
20 Dordrecht, 2001.

Заболевания, развивающиеся вследствие мутаций генов соматических клеток, и сопровождающиеся развитием соматического мозаицизма, вовсе не имеют средств этиологической терапии, осуществляется лишь симптоматическое лечение, см. Youssoufian H, Pyeritz RE. Mechanisms and  
25 Consequences of Somatic Mosaicism in Humans,. Nature Reviews Genetics, 2002;3:748-758.

Основной проблемой антибиотикотерапии бактериальных инфекций считается проблема лекарственной резистентности. Циркуляция резистентных к антибиотическим средствам штаммов бактерий и их новообразование в  
30 процессе лечения (например, вследствие формирования в организме больного биопленок) являются основной причиной неэффективной терапии (The use and resistance to antibiotics in the community. Cizman M, Int J Antimicrob Agents,

2003, Apr 21: pp.297-307. Общеизвестно, что проблема антибиотикорезистентности микроорганизмов в настоящее время носит характер глобальной угрозы (Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millennium. Sefton A.M., Drugs, 2002, vol. 62: 557-66) и требует разработки новых антибиотических препаратов с оригинальными механизмами антибактериального воздействия и новых неантибиотических способов воздействия на инфекционный процесс. В частности, при лечении инфекции, вызванной резистентными к пенициллиновым и цефалоспориновым антибиотикам грамм-положительными кокками, используется антибиотик Ванкомицин. К основным его недостаткам относятся: рост количества ванкомицин-резистентных штаммов в циркуляции; высокая токсичность; относительно узкий спектр активности препарата (The threat of vancomycin resistance. PerlTM, Am J Med 1999 May 106:26S-37S).

В связи с перечисленным является актуальной задача поиска метода антибактериальной терапии эффективного, малотоксичного, активного в отношении широкого спектра бактерий, в том числе резистентных к антибиотическим препаратам.

Проблемы антибиотико и химиотерапии инфекций, вызываемых грибами и простейшими, носят, в основном, тот же характер, что и проблемы антибиотикотерапии бактериальных инфекций; например, при лечении широко распространенным антигрибковым агентом амфотерицином (Antifungal drug resistance to azoles and polyenes, Mar Masiá Canuto et.al., The Lancet Infectious Diseases, Volume 2, Issue 9 , 1 September 2002, Pages 550-563; A systematic review of the antifungal effectiveness and tolerability of amphotericin B formulations, Jane P. Barrett et.al., Clinical Therapeutics ,Volume 25, Issue 5 , May 2003, Pages 1295-1320).

Атеросклероз представляет собой системное заболевание, сопровождающееся формированием специфических атеросклеротических бляшек в стенках крупных и средних артерий. В зависимости от места появления, стадии развития и величины атеросклеротических бляшек заболевание имеет различные клинические проявления (ишемическая болезнь сердца, инсульт и др.). Лекарственному и хирургическому лечению

подвергаются именно проявления системного атеросклероза на уровне того или иного органа. Атеросклероз как системное заболевание не имеет способов лекарственного лечения. Наиболее распространенным способом профилактики, замедляющим прогрессирование заболевания, является терапия ингибиторами 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзим А(HMGCoA) редуктазы (Ловастатин, Парвастатин и др.), приводящая к подавлению синтеза эндогенного холестерина и ускорению клиренса липопротеинов низкой плотности из плазмы крови, что замедляет развитие атеросклероза (New Concepts and Paradigms in Cardiovascular Medicine: The Noninvasive Management of Coronary Artery Disease, K. Lance Gould, THE AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE, Volume 104, June 22, 1998, 2s-17s). Недостатками подобного лечения являются серьезные побочные эффекты (A safety look at currently available statins., Moghadasian MH, Expert Opin Drug Saf 2002 Sep 1:pp.269-74) и ограниченная эффективность (Statins: balancing benefits, efficacy and safety., Clearfield MB, Expert Opin Pharmacother, 2002, May 3:pp.469-77).

Основной причиной инвалидизации и смерти больных при сахарном диабете 1 и 2 типа являются осложнения, связанные с развитием микро и макроангиопатий. Считается, что достижение эффективного метаболического контроля (поддержание нормального уровня глюкозы и гликозилированного гемоглобина в физиологических границах в течение длительного времени) препятствует развитию осложнений. Инсулинотерапия, в том числе интенсивная, является методом выбора в ситуациях, когда не удается достичь метаболического контроля с помощью других лекарственных средств (Outpatient insulin therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus: scientific review., DeWitt DE, Hirsch IB, JAMA, 2003, May 289:pp.2254-64). Однако даже при интенсивных режимах терапии риск развития осложнений, в том числе фатальных, остается высоким (Cause-specific mortality in a population with diabetes: South Tees Diabetes Mortality Study., Roper NA, et.al., Diabetes Care, 2002, Jan 25:pp.43-8). В связи с перечисленным является актуальной и общепризнанной задача поиска новых средств для терапии сахарного диабета 1 и 2 типа, в том числе способных предупреждать развитие осложнений.

Одним из наиболее широко применяемых в клинической практике способов, применяемых для лечения состояний, связанных с реакциями гиперчувствительности замедленного типа, является введение пептида Циклоспорина А (Therapeutic Immunosuppression, ed.A.W.Thomson, Ser.Immunology and Medicine vol.29, Kluwer Acad.Publishers, Dordrecht, 2001). К широко известным недостаткам этого способа относятся серьезные побочные эффекты – нефротоксичность, гипертензия и высокий риск развития инфекций (Cyclosporine: mechanisms of action and toxicity., Graham RM, Cleve Clin J Med, 1994, Jul-Aug 61:pp.308-13). Другой проблемой является потеря эффективности при длительном применении препарата, что проявляется, например, в увеличении вероятности отторжения трансплантата (Renal transplantation, past, present and future., Ponticelli C, et.al., J Nephrol, 1999, Jul-Aug 12 Suppl 2:S105-10).

Таким образом, для лечения заболеваний, сопровождающихся изменениями качественного и/или количественного состава внеклеточной ДНК крови, применяется широкий спектр различных способов, имеющих схожие недостатки: токсичность; развитие побочных эффектов; низкая эффективность терапии.

Между тем, в реальной клинической практике рассматриваемые заболевания часто сопутствуют одно другому. Так, например, терапия иммуносупрессивными препаратами при заболеваниях, связанных с реакцией гиперчувствительности замедленного типа многократно повышает риск развития инфекционных заболеваний (Recent advances in the diagnosis and management of infection in the organ transplant recipient. Tolkoff-Rubin NE, Rubin RH; Semin Nephrol 2000 Mar 20:148-63.); атеросклероз является частым осложнением диабета (Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management.Beckman JA, Creager MA, Libby P;JAMA 2002 May 287:2570-81 .), и при этом часто его развитию сопутствует системный инфекционный процесс (Infection and atherosclerosis: potential roles of pathogen burden and molecular mimicry., Epstein SE, Zhu J, Burnett MS, Zhou YF, Vercellotti G, Hajjar D, Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000 Jun 20:1417-20.); ряд форм диабета развивается вследствие развития реакции

гиперчувствительности замедленного типа (Evidence of islet cell autoimmunity in elderly patients with type 2 diabetes., Pietropaolo M, Barinas-Mitchell E, Pietropaolo SL, Kuller LH, Trucco M, Diabetes 2000 Jan 49:32-8), или на фоне инфекционного процесса (Systemic diseases caused by oral infection. Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I, Clin Microbiol Rev 2000 Oct 13:547-58 ), и приводит к высокому риску развития инфекций (Diabetes and the risk of infection-related mortality in the U.S., Berton AG, Saydah S, Brancati FL, Diabetes Care 2001 Jun 24:6 1044-9).

В настоящее время отсутствуют какие-либо способы, которые позволяли бы лечить указанные выше заболевания в комплексе. В связи с этим отсутствует возможность принять какое-либо известное техническое решение за прототип настоящего изобретения.

#### Раскрытие изобретения

15

В основу настоящего изобретения положено решение задачи создания высокоэффективного и малотоксичного способа лечения заболеваний, как по отдельности, так и в комплексе, сопровождающихся изменениями качественного и/или количественного состава внеклеточной ДНК крови, а именно, генерализованных инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями, заболеваний, вызываемых грибами и простейшими, атеросклероза, сахарного диабета, аллергических заболеваний, связанных с реакцией гиперчувствительности замедленного типа, заболеваний, обусловленных мутациями генов соматических клеток.

Согласно изобретению эта задача решается за счет того, что для лечения заболеваний человека, сопровождающихся изменениями качественного или количественного состава внеклеточной ДНК крови, а именно, генерализованных инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями, заболеваний, вызываемых грибами и простейшими, атеросклероза, сахарного диабета, аллергических заболеваний, связанных с реакцией гиперчувствительности замедленного типа, заболеваний, обусловленных мутациями генов соматических клеток, в системную циркуляцию крови вводят

агент, разрушающий внеклеточную ДНК крови; в качестве агента, разрушающего внеклеточную ДНК крови, в системную циркуляцию крови может вводиться фермент ДНКазы; фермент ДНКазы могут вводить в дозах, обеспечивающих изменение электрофоретического профиля внеклеточной ДНК крови, выявляемое пульс-гельэлектрофорезом; фермент ДНКазы могут вводить в дозах и режимах, обеспечивающих уровень ДНК-гидролитической активности плазмы крови, измеряемый в плазме крови и превышающий 150 единиц Кунца на литр плазмы, на протяжении суммарно более 12 часов в сутки.

10 Развитие указанных заболеваний сопровождается качественными и количественными изменениями внеклеточной ДНК крови, однако в известных заявителю источниках отсутствуют знания о генетическом репертуаре внеклеточной ДНК крови больных при рассматриваемых заболеваниях, биологической роли внеклеточной ДНК крови при рассматриваемых  
15 заболеваниях и возможном терапевтическом эффекте ее уничтожения для лечения этих заболеваний, что позволяет сделать вывод о соответствии изобретения критерию «новизна» (N).

Как установили заявители, внеклеточная ДНК крови больных при рассматриваемых заболеваниях содержит уникальный по своему  
20 качественному и количественному составу репертуар генов и регуляторных генетических элементов, резко отличающийся от репертуара ДНК, описанного в геноме человека. В отличие от внутриклеточной ДНК, внеклеточная ДНК крови больных рассматриваемыми заболеваниями содержит, в основном, уникальные гены человека. Установлено наличие бактериальной внеклеточной  
25 ДНК и внеклеточной ДНК грибов в составе матрикса биопленок и в плазме крови инфицированного человека.

Установлено, что внеклеточная ДНК крови, включая внеклеточную ДНК бактерий, грибов и паразитов при рассматриваемых заболеваниях способствует их развитию.

30 Установлено, что разрушение внеклеточной ДНК крови при рассматриваемых заболеваниях приводит к лечебному эффекту.

Указанные выше новые свойства заявленного изобретения, базирующиеся на принципиально новых представлениях о роли внеклеточной ДНК плазмы крови в развитии рассматриваемых заболеваний, позволяют сделать вывод о соответствии заявленного способа критерию «изобретательский уровень» (IS).

#### Краткое описание чертежей

В дальнейшем изобретение поясняется подробным описанием примеров его осуществления без ссылок на чертежи

#### Лучший вариант осуществления изобретения

Заявленный способ реализуется следующим образом.

##### 15 Материалы и методы.

Использовали следующие агенты, разрушающие внеклеточную ДНК крови: фермент бычьего панкреатическую ДНКазу (производство Sigma и Самсон-Мед), фермент рекомбинантную человеческую ДНКазу I (производство Genetech), ДНК-гидролизующие антитела, выделенные из крови больных системной красной волчанкой по методике Shuster A.M (Shuster A.M. et.al., Science, v.256, 1992, pp.665-667).

ДНК плазмы крови выделяли следующим образом: свежую (не более 3-4 часов после забора) плазму крови с добавленным антикоагулянтом (цитрат натрия) откручивали на подушке из Ficoll-PlaquePlus (Amersham-Pharmacia) при 1500g 20 минут при комнатной температуре. Плазму (1/2 от всего количества) аккуратно отбирали, не задевая остаток клеток на подушке фиколла, и откручивали при 10 000 g 30 минут, чтобы избавиться от обломков клеток и дебриса. Супернатант отбирали, не затрагивая осадок, добавляли до 1% саркозила, до 50мМ трис-HCl, pH 7,6, до 20 мМ ЭДТА, до 400 мМ NaCl, и равный объем смеси фенол-хлороформ 1:1. Полученную эмульсию инкубировали при 65°C 2 часа, затем отделяли фенол-хлороформ центрифугированием при 5000g в течении 20 минут при комнатной



температуре. Процедуру депротеинизации фенол-хлороформом повторяли идентичным способом трижды, после чего водную фазу обрабатывали хлороформом, затем диэтиловым эфиром. Отделение от органических растворителей производили центрифугированием при 5000g в течение 15 минут. К полученной водной фазе добавляли равный объем изопропанола и инкубировали в течение ночи при 0°C. После осаждения нуклеиновые кислоты отделяли центрифугированием при 0°C, 10000g в течение 30 минут. Осадок нуклеиновых кислот растворяли в буфере, содержащем 10мМ трис-HCl, pH 7,6, 5 мМ ЭДТА, и наносили на подушку из ступенчатого хлористого цезия (1M, 2.5M, 5.7M) в центрифужной пробирке для ротора SW60Ti. Объем ДНК составлял 2 мл, объем каждой ступеньки CsCl – по 1 мл. Ультрацентрифугирование проводили в приборе L80-80 (Beckman) 3 часа при 250000 g. ДНК отбирали с поверхности ступеньки 5.7M по фракциям. Фракции диализировали 12 часов при 4°C. Наличие ДНК во фракциях определяли агарозным электрофорезом, с визуализацией ДНК бромистым этидием. Количество ДНК определяли спектрофотометрически (Beckman DU70) в кювете объемом 100мкл, снимая спектр от 220 до 320 нм.

Пример 1. Лечение экспериментального сепсиса, вызванного *Candida Albicans* и *St.Aureus*.

В эксперименте использовали белых беспородных мышей весом 23-25 грамм.

Группа 1 (30 мышей) - мышам вводили в ретроорбитальный синус бактерии патогенного штамма *Staphylococcus aureus* VT-2003R в дозе  $1 \times 10^{10}$  бактериальных клеток на мышь. Рекомбинантная дорназа-альфа (Geneyeche) вводилась в дозе 500 мкг/кг внутривбрюшинно через 2, 6, 10 и 14 часов после инфицирования.

Группа 2 (10 мышей) - мышам вводили в ретроорбитальный синус бактерии патогенного штамма *Staphylococcus aureus* VT-2003R в дозе  $1 \times 10^{10}$  бактериальных клеток на мышь. Фосфатный буфер вводился внутривбрюшинно через 2, 6, 10 и 14 часов после инфицирования.

После последнего введения дорназы из 24 мышей 1 группы были выделены подгруппы 1а и 1б.

Подгруппа 1а (8 мышей) - через 2 часа после последнего введения дорназы мышам вводили внутривенно внеклеточную ДНК крови (0,1 мкг на мышь), полученную от мышей, инфицированных *Staphylococcus aureus* VT-2003R в дозе  $1 \times 10^{10}$  бактериальных клеток на мышь через 15 часов после введения бактерий в ретроорбитальный синус.

Подгруппа 1в (8мышей) - через 2 часа после последнего введения дорназы мышам ввели внутривенно внеклеточную ДНК крови (0,1 мкг на мышь), полученную от мышей инфицированных *Candida Albicans* в дозе LD50 на мышь через 3 дня после внутривенного введения грибов.

Оценивали выживаемость животных через 32 часа после инфицирования. Результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1

Выживаемость мышей в различные сроки после инфицирования

	0 час.	2 час.	4 час.	6 час.	8 час.	12 час.	24 час.	28 час.	32 час.
Группа 1	100%	100%	100%	90%	90%	80%	50%	40%	30%
Группа 2	100%	100%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	20%
1а							20%	10%	10%
1в							50%	50%	40%

Группа 3 (10 мышей) - мышам вводили внутривенно грибы, субкультивированные, полученные из патогенного коинического изолята *Candida Albicans* в дозе LD50. Рекомбинантная дорназа-альфа (Geneyeche) вводилась в дозе 1мг/кг внутривенно дважды в день на 2, 3 и 4 день после инфицирования.

Группа 4 (10 мышей) - мышам вводили внутривенно грибы, субкультивированные, полученные из патогенного коинического изолята *Candida Albicans* в дозе LD50. Амфотерицин В вводился в дозе 20мкг/кг внутривенно дважды в день на 2,3 и 4 день после инфицирования.

Группа 5 (10 мышей) - мышам вводили внутривенно грибы, субкультивированные, полученные из патогенного коинического изолята *Candida Albicans* в дозе LD50. В качестве негативного контроля вводился

фосфатный буфер внутривенно дважды в день на 2, 3 и 4 день после инфицирования.

Оценивали выживаемость и массу мышей на 7 день после инфицирования. Результаты приведены в таблице 2.

5

Таблица 2

Выживаемость мышей в различные сроки после инфицирования:

	1 день	3 день	5 день	7 день
Группа 3	100%	100%	100%	100%
Группа 4	100%	100%	100%	100%
Группа 5	100%	80%	50%	50%

В группе 4 на 7 день вес животных составлял в среднем на 20% меньше, чем в группе 3. Это свидетельствует о том, что при равной защитной эффективности дорназы-альфа и амфотерицина В, последний проявлял  
10 большую токсичность.

Таким образом, внеклеточная ДНК крови инфицированных животных оказывает негативное влияние на течение инфекционного процесса, а ее разрушение согласно заявляемому методу оказывает лечебный эффект при бактериальной и грибковой инфекции.

15

Пример 2. Лечение генерализованной бактериальной инфекции (сепсиса).

38-летний мужчина был доставлен на терапевтическое отделение в тяжелом состоянии. За 12 дней до госпитализации у больного амбулаторно было диагностировано острое респираторное заболевание. За 5 дней до  
20 госпитализации в связи с субфебрильной температурой, наличием выраженной астении и болей в правой половине грудной клетки больному был установлен диагноз пневмонии. Больному были прописаны инъекции цефазолина и пероральный прием рокситромицина, однако улучшения не наступило, и за 2  
25 дня до госпитализации у него развилась лихорадка (39,5-40<sup>0</sup>С), тошнота, рвота, головная боль. В последний перед госпитализацией день присоединились множественные геморрагические высыпания на коже, болезненность в мышцах, желтуха и диарея. При поступлении – температура 38,3, давление 100

на 60, тахикардия до 120 в минуту, менингеальные симптомы отрицательные, конечности холодные и цианотичные. Кожа желтушная. Геморрагические высыпания на внутренних поверхностях рук и ног. Лабораторно – умеренный лейкоцитоз со сдвигом формулы (18% юных форм), токсическая зернистость нейтрофилов, повышение прямого билирубина, АСТ и АЛТ. При 5 ультразвуковом исследовании печени – множественные мелкие гипэхогенные очаги. Больному был поставлен диагноз сепсиса. Был осуществлен посев крови. Больной получал парентерально комбинацию Гентамицин\Ампициллин\Метронидазол, гепарин, вазодилататоры. Несмотря на проводимую антимикробную полихимиотерапию, сеансы гемосорбции и трансфузии донорской плазмы состояние больного продолжало ухудшаться. Развился острый респираторный дистресс-синдром. Через 2 суток после поступления больной был переведен в реанимационное отделение и подключен к аппарату искусственной вентиляции легких. Из крови больного был высеян S 15 . pneumoniae, в связи с чем больному были назначены инфузии Ванкомицина. В течение последующих 48 часов, несмотря на введение ванкомицина состояние больного ухудшилось, выросли явления полиорганной недостаточности. С согласия родственников больного были начаты внутривенные инфузии бычьей панкреатической ДНКазы в дозе 800 мг/сутки (1 600 000 ЕД Кунца) в виде 20 постоянной продолжающейся инфузии. Через 12 часов после начала инфузии появились признаки стабилизации состояния больного. Появились признаки улучшения периферической циркуляции крови, улучшились показатели системной гемодинамики, началось мочеобразование. В течение последующих 5 дней на фоне продолжающихся инфузий ДНКазы лабораторные показатели 25 больного приблизились к норме, полностью восстановилась гемодинамика, функция почек и больной был переведен на самостоятельное дыхание.

Таким образом, применение ДНКазы согласно заявляемому способу оказывает лечебный эффект при системном бактериальном поражении.

#### Пример 3. Лечение церебральной малярии.

30 40 мышей C57Bl получили внутрибрюшинную инъекцию эритроцитов, полученных от мышей линии BALB/c, инфицированных P. Bergehi (10<sup>6</sup> эритроцитов на мышь).

Группа 1 (10 мышей) - начиная с 24 часов после инфицирования мышам вводили рекомбинантную дорназу-альфа (Genetech) в дозе 500 мкг/кг четыре раза в день внутримышечно на протяжении 3 дней.

Группа 2 (10 мышей) - получали инъекции фосфатного буфера.

5       Группа 3 (10 мышей) - начиная с 24 часов после инфицирования мышам вводили рекомбинантную дорназу-альфа (Genetech) в дозе 500 мкг/кг четыре раза в день внутримышечно на протяжении 3 дней. На следующий день мышам ввели внутривенно внеклеточную ДНК крови (0,1 мкг на мышь), полученную от мышей C57Bl на 5-й день инфекции P. Berghei.

10       Группа 4 (10 мышей) - начиная с 24 часов после инфицирования мышам вводили рекомбинантную дорназу-альфа (Genetech) в дозе 500 мкг/кг четыре раза в день внутримышечно на протяжении 3 дней. На следующий день мышам ввели внутривенно внеклеточную ДНК крови (0,1 мкг на мышь), полученную от интактных мышей C57Bl.

15       Оценивали выживаемость мышей в опытной и контрольной группах через 7 дней после инфицирования. Результаты эксперимента приведены в таблице 3.

Таблица 3

Выживаемость мышей через 7 дней после инфицирования

	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Выживаемость, %	90	10	50	80

20       Таким образом, внеклеточная ДНК крови животных, инфицированных малярией, оказывает негативное влияние на течение инфекционного процесса, а ее разрушение согласно заявленному изобретению оказывает лечебный эффект при паразитарной инфекции.

Пример 4. Влияние терапии ДНКазой на жизнеспособность бета-клеток  
25       поджелудочной железы и эндотелия аорты.

Использовали рекомбинантную человеческую ДНКазу I (Genetech).

30       Бета-клетки эмбриональной поджелудочной железы человека и эндотелиальные клетки аорты человека использовали для формирования первичной клеточной культуры. Через 24 часа после пассажа в одной экспериментальной серии в клеточные культуры добавляли внеклеточную

ДНК, выделенную из плазмы больного тяжелой формой диабета 2 типа и системным атеросклерозом (0,0025 мкг ДНК на 1 мл культуральной среды) а в другой экспериментальной серии ДНК того же больного перед введением в культуру подвергали обработке ДНКазой (1мкг/мл; 37С; 30 минут). Через 24 часа оценивали содержание жизнеспособных клеток по включению красителя трипанового синего.

Результаты эксперимента приведены в таблице 4:

Таблица 4

Содержание жизнеспособных клеток через 48 часов после пассирования  
(в процентах).

Клетки	Контроль	ДНК больного	ДНК больного, обработанная ДНКазой
В-клетки	73%	43%	61%
Эндотелий	62%	35%	55%

Таким образом, внеклеточная ДНК крови больного тяжелым диабетом II типа и атеросклерозом оказывает негативное воздействие как на здоровые В-клетки поджелудочной железы, так и на здоровые эндотелиальные клетки. Разрушение внеклеточной ДНК крови больного ферментом ДНКазой препятствует этому согласно заявляемому способу.

#### Пример 5. Лечение атеросклероза.

Мужчина 54 лет поступил в клинику в тяжелом состоянии с жалобами на сильные боли в области живота, диарею; интенсивные боли в ногах при ходьбе, потерю веса. 12 лет назад у больного был выявлен сахарный диабет 2 типа и назначен прием глибенкламида. 15 месяцев назад впервые появились эпигастральные боли, возникающие после приема пищи. Больному был назначен прием антацидных средств, однако боли усиливались, в последние 3 месяца присоединилась обильная стеаторея. В последние дни перед госпитализацией развилась анорексия вследствие интенсивного болевого синдрома. При обследовании выявлено значительное истощение (вес тела - 44 кг при поступлении; снижение на 28 кг за последние 5 месяцев), отсутствие

пульсации артерий ног. При фиброгастродуоденоскопии и колоноскопии не выявлено органических изменений. ЭКГ – в норме. В крови – умеренное повышение холестерина и фракции липопротеидов низкой плотности, гликозилированный гемоглобин -11%. При аортографии выявлена частичная окклюзия аорты ниже почечных артерий (70 %), частичная окклюзия подвздошных артерий (90%), полная окклюзия верхней и нижней мезантериальных артерий. В связи с невозможностью хирургического лечения было принято решение о консервативном лечении. Больной был переведен на интенсивное парентеральное питание. Была назначена инсулинотерапия.

10 Проводилась антиагрегантная терапия. С согласия больного были начаты внутривенные инфузии бычьей панкреатической дезоксирибонуклеазы в дозе 800 мг/сутки (1 600 000 ЕД Кунца) в виде 4 двухчасовых инфузий ежедневно. На 7 день после начала терапии больной начал принимать диетическую пищу. Болевой синдром не возобновлялся. К 20 дню больной получал полноценное

15 энтеральное питание. Самочувствие значительно улучшилось, начался прирост массы тела. На 45 день в связи с подготовкой больного к оперативному лечению была проведена повторная ангиография. Выявлено снижение степени окклюзии аорты и подвздошных артерий на 20% и 30% соответственно, появление кровотока в верхней и нижней мезантериальных артериях (окклюзия

20 80%).

Образцы внеклеточной ДНК данного больного клонированы с использованием метода, позволяющего конструировать неамплифицированные плазмидные библиотеки внеклеточной ДНК крови с представительностью до миллиона клонов со средним размером в 300-25 500 пар оснований.

Выделенная по ранее описанному протоколу ДНК была подвергнута дополнительной тщательной депротеинизации с применением протеиназы К (Sigma) при 65°C для удаления прочно связанных белков. После депротеинизации и однократной обработки фенол-хлороформом при 65°C, ДНК 30 осаждали 2,5 объемами этанола в течение ночи. Затем ДНК либо обрабатывали рестриктазой EcoRI в течение 3 часов, либо Pfu полимеразой (Stratagene) в присутствии 300 мкМ всех дезоксинуклеотидтрифосфатов для удаления

- липких концов. Достроенную ДНК фосфорилировали полинуклеотидкиназой T4 (30U, 2 ч.). Полученные препараты лигировали в плазмиду pBluescript (Stratagene), переваренную EcoRI или PvuII соответственно, и дефосфорилированную щелочной фосфатазой CIP (Fermentas) в течение 1 часа.
- 5 Для лигирования обычно использовали 1 мкг вектора и 0,1-0,5 мкг сывороточной ДНК. Лигирование проводили при помощи Rapid Ligation Kit (Roche) 10 часов при 16°C. Объем лигазной смеси составлял 50 мкл. Лигированную библиотеку трансформировали в клетки DH12S (Life Technologies) с применением электропоратора E. Coli porator (BioRad). Для
- 10 трансформации одной библиотеки использовали 12-20 электропорационных кювет. Для контроля на чашки с 1,5% агаром и средой LB, содержащей 100мкг/мл ампициллина, высевали разведения библиотеки  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  и  $10^{-6}$ . В обоих случаях представительность библиотеки составляла примерно  $2-3 \cdot 10^6$  клонов.
- 15 Анализ случайно выбранных 75 клонов с длиной от 300 до 1000 пар оснований из библиотеки, полученной из внеклеточной ДНК крови больного до начала лечения показал, что 56 из 75 клонов представляют собой уникальные последовательности ДНК человека. Из 56 фрагментов уникальной ДНК, функция или продукт соответствующего гена с помощью
- 20 HumanGeneBank были идентифицированы для 11 последовательностей:

Gene or corresponding protein product	Reported role in Atherosclerosis and Diabetes
neutral endopeptidase	Активность повышена в эндотелиальных клетках, гладкомышечных и стромальных клетках интимы артерий при атеросклерозе, подавление активности может снижать накопление липидов в стенке сосуда.
muskelin 1	Является медиатором клеточного ответа на Тромбоспондин 1. Тромбоспондин 1 – опосредуемые процессы являются признанным патофизиологическим компонентом развития



	атеросклеротического поражения артериальной стенки.
Nf-kappaB	Активность повышена в клетках артериальной стенки при гипергликемии и атеросклерозе.
Transient receptor potential cation channel	
Phospholipase C, epsilon	Индукцирует экспрессию рецептора липопротеинов низкой плотности
CRTL1: cartilage linking protein 1	
17kD fetal brain protein	
Nicotinamide nucleotide transhydrogenase	
BAI3: brain-specific angiogenesis inhibitor	
GAD2: glutamate decarboxylase 2	Один из основных аутоантигенов при диабете 1 типа
E-selectin	Высокий уровень экспрессии является фактором риска развития ангиопатии при диабете 2 типа

Анализ случайно выбранных 50 клонов из библиотеки, полученной из  
 5 внеклеточной ДНК крови больного через 21 день после начала лечения  
 показал, что более 90% выявленных последовательностей клонов представляют  
 собой короткие фрагменты повторяющейся ДНК генома человека, в основном  
 5 альфа-сателлитную ДНК. Параллельно наблюдались изменения  
 электрофоретического профиля внеклеточной ДНК плазмы, выявляемые пульс-  
 гельэлектрофорезом

Таким образом, применение ДНКазы согласно заявляемому способу  
 оказывает лечебный эффект при атеросклерозе.

10 Пример 6. Лечение сахарного диабета.

Плохой метаболический контроль диабета, выражающийся в высоком  
 содержании гликозилированного гемоглобина в крови и низкая

чувствительность к инсулину, требующая введения высоких доз препарата являются основными факторами, предрасполагающими к развитию осложнений, инвалидизации и смерти больных.

Больной 46 лет страдает диабетом 2 типа в течение 3 лет. Ранее  
 5 лечащим врачам не удалось добиться нормогликемии с помощью оральных  
 антидиабетических средств и 2 года назад больному был назначен  
 рекомбинантный человеческий инсулин длительного действия в дозе 0,3U/kg  
 (21U) в сутки. Однако уровень гликозилированного гемоглобина в крови  
 продолжал оставаться высоким (более 10%), нарастали проявления  
 10 диабетической ангиопатии с полинейропатией и ослаблением зрения. За 2 года  
 суточная потребность в инсулине выросла до 1,2 U/kg (84U) в сутки. Больному  
 были прописаны внутримышечные инъекции бычьей панкреатической ДНКазы  
 в дозе 200 мг в сутки (две инъекции в сутки) на протяжении 4-х месяцев. К  
 концу курса лечения самочувствие больного значительно улучшилось,  
 15 снизилось содержание гликозилированного гемоглобина в крови, удалось в 2  
 раза снизить суточную дозу инсулина. Результаты приведены в таблице 5.

Таблица 5

Эффект лечения ДНКазой на метаболические показатели пациента

	До начала лечения	Через 3 месяца	Через 4 месяца
Гликозилированный гемоглобин (%)	13,2	10,1	7,2
Потребность в инсулине U/kg массы тела	1,2	0,9	0,6
Количество внеклеточной ДНК плазмы крови (%).	100	85	70

Количество внеклеточной ДНК плазмы крови оценивали, осуществляя  
 20 денситометрию электрофореграмм. За 100% принимали содержание  
 внеклеточной ДНК плазмы до начала лечения.

Таким образом, применение ДНКазы при диабете оказывает лечебный  
 эффект согласно заявляемому способу.

Пример 7. Подавление активации лимфоцитов.

20 мышей C57Bl иммунизировали суспензией *Mycobacterium Smegmatis* (100мкг антигена в 50 мкл алюминиевых квасцов) подкожно в подушечку лапы. Через 4 недели мышей забивали и выделяли спленоциты. Спленоциты 5 сенсibilизированных и интактных мышей культивировали в чашках Петри в суспензионной культуре ( $2,5 \times 10^6$  клеток/мл) в среде RPMI 1640 с 2мМ глутамина, антибиотиками и 10 эмбриональной телячьей сыворотки в присутствии антигена *Mycobacterium Smegmatis* (5мкг/мл) в течение 24 часов в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Для определения степени активации 10 спленоцитов под влиянием антигена за 6 часов до окончания срока культивирования в среду добавляли [3H] тимидин до финальной концентрации 0,1мCi/мл. После окончания срока культивации клетки отмывали, растворяли в формамиде и измеряли радиоактивность.

Серия 1 (5 чашек). Спленоциты сенсibilизированных мышей.

15 Серия 2 (5чашек). Спленоциты сенсibilизированных мышей. В среду добавляли рекомбинантную дорназу-альфа (Genetech) в концентрации 1 мкг/мл.

Серия 3 (5 чашек). Спленоциты интактных мышей.

Серия 4 (5 чашек). Спленоциты интактных мышей. В среду добавляли 20 внеклеточную ДНК крови, выделенную из крови сенсibilизированных мышей через 2 часа после повторного подкожного введения антигена *Mycobacterium Smegmatis* в дозе 200 мкг. ДНК добавляли в количестве 0,05 мкг/мл.

Серия 5 (5 чашек). Спленоциты интактных мышей. В среду добавляли 25 внеклеточную ДНК крови, выделенную из крови интактных мышей через 2 часа после повторного подкожного введения антигена *Mycobacterium Smegmatis* в дозе 200 мкг. ДНК добавляли в количестве 0,05 мкг/мл.

Серия 6 (5 чашек). Спленоциты интактных мышей, культивировавшиеся без добавления антигена.

Включение спленоцитами [3H] тимидина через 24 часа после 30 культивирования с антигеном.

Результаты эксперимента представлены в таблице 6.

Таблица 6

## Подавление активации лимфоцитов

№ серии	Количество лимфоцитов (СРМ)
1	115000
2	75000
3	35000
4	95000
5	40000
6	15000

Таким образом, внеклеточная ДНК плазмы крови усиливает специфическую активацию лимфоцитов под влиянием антигенной стимуляции, а применение ДНКазы приводит к подавлению антигенной активации лимфоцитов согласно заявляемому способу.

Пример 8. Лечение аллергии, связанной с реакцией гиперчувствительности замедленного типа.

Мужчина 23 лет поступил в клинику в тяжелом состоянии. Четыре года назад, в 1999 году у него был диагностирован хронический миелолейкоз. Пациент ранее получал терапию препаратами гидроксимочевины и альфа-интерферона. Быстрое прогрессирование болезни потребовало проведения процедуры трансплантации костного мозга. Была проведена трансплантация костного мозга от HLA – совместимого, но ABO несовместимого донора с тотальным облучением и введением циклофосфана. Для профилактики РТПХ больной получал метотрексат.

На 9 день развилась выраженная реакция РТПХ с генерализованной сыпью и диареей. В течение 9 дней больной получил пульс-терапию метилпреднизолоном и антилимфоцитарным глобулином. Состояние больного улучшилось. К 30-му дню функция костного мозга восстановилась и больной был выписан.

Через неделю больной вновь поступил в клинику с лейкопенией (лейкоциты  $0,9 \cdot 10^9$ ), изъязвлениями в полости рта и лихорадкой. Аспирационная биопсия костного мозга выявила гипоплазию и эозинофилию.

Была назначена терапия Азатиоприном и Лейкомаксом, но через 6 дней вновь развилась лейкопения (лейкоциты  $0,7 \cdot 10^9$ ). Азатиоприн был отменен и была проведена повторная пульс-терапия метилпреднизолоном в сочетании с лейкомаксом. Лихорадка, лейкопения и изъязвления в полости рта оставались.

- 5 Вскоре после окончания терапии у больного развились эпизоды внутрисосудистого гемолиза, на фоне прогрессирования которых продолжилось падение уровня лейкоцитов и тромбоцитов. Больному были назначены внутривенные инфузии бычьей панкреатической дезоксирибонуклеазы в дозе 400 мг/сутки (800 000 ЕД Кунца) в виде 6  
10 однократных инфузий ежедневно в течение 2 недель. При этом уровень ДНК гидролитической активности, измеряемый в плазме крови, превысил 180 ЕД Кунса на литр плазмы в течение более 12 часов. Начиная с 5 дня состояние больного стало улучшаться. Содержание лейкоцитов возросло к 7 дню до  $1,7 \cdot 10^9$ , а к 15 дню составило  $2,4 \cdot 10^9$ , исчезли признаки гемолиза,  
15 нормализовалась температура и произошла санация язв в полости рта. Нормализовалось содержание гемоглобина и эритроцитов. Пациент был выписан в удовлетворительном состоянии. При контрольном визите госпитализации через месяц формула крови в порядке.

- Таким образом, применение ДНКазы согласно заявляемому способу  
20 оказывает лечебный эффект при аллергических заболеваниях, связанных с гиперчувствительностью замедленного типа.

#### Пример 9. Подавление распространения мутантного гена.

- Ряд заболеваний человека возникают вследствие развития состояния соматического мозаицизма – экспансии мутантного гена в популяции  
25 соматических клеток (Yousoufian H, Pyeritz RE. Mechanisms and Consequences of Somatic Mosaicism in Humans. Nature Reviews Genetics 2002;3:748-758.)

- В качестве модели развития соматического мозаицизма была изучена частота мутаций гена HPRT в Т-лимфоцитах крови. Человеческий HPRT ген (Хромосома Хq26) кодирует конститутивно экспрессируемый, но не  
30 эссенциальный фермент, вовлеченный метаболизм пуриновых оснований. Клонирование проводили по методике, описанной Bigbee W (Bigbee W. Et al., Mutation Res., 1998, v.397, pp.119-136). Клонированию подвергались лимфоциты

периферической крови 8 больных, получавших курс 3-х недельной иммуностимулирующей терапии препаратом Неовир после хирургического удаления опухоли. Из 8 больных 4 пациента дополнительно получали терапию человеческой рекомбинантной ДНКазой I (Genetech) (200 мкг/кг внутривенно, 5 4 раза в сутки в течение 3 недель). Частота встречаемости HPRТ-дефицитных клонов в крови больных, получавших терапию ДНКазой I, в среднем была в 3 раза ниже таковой в крови больных, получавших только иммуностимулирующую терапию. Добавление внеклеточной ДНК крови 10 больных, не получавших ДНКазу в культуральную среду при клонировании Т – лимфоцитов больных, получавших терапию ДНКазой, повышает частоту встречаемости HPRТ-дефицитных клонов при клонировании последних.

Таким образом, разрушение внеклеточной ДНК крови больного ферментом ДНКазой препятствует развитию соматического мозаицизма согласно заявляемому способу.

15       Пример 10. Уничтожение патогенных свойств внеклеточной ДНК крови различными способами разрушения.

Мыши С57В1 получили прививку высокометастатического или низкометастатического штамма опухоли LLC. На 9 день после перевивки животных усыпляли и собирали суммарную плазму крови мышей. Суммарная 20 фракция внеклеточной ДНК крови после выделения хранилась при  $-20^{\circ}\text{C}$  в фосфатном буфере.

В эксперименте участвовало 7 групп мышей, привитых низкометастатическим штаммом LLC.

Группа 1 – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC.

25       Группа 2 – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двукратное (на седьмой и восьмой день после перевивки) введение суммарной фракции внеклеточной ДНК мышей с привитым высокометастатическим штаммом (0,05 мкг ДНК перед введением растворялись в 500 мкл свежей гепаринизированной крови).

30       Группа 3 – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двукратное (на седьмой и восьмой день после перевивки) введение суммарной фракции ДНК мышей с привитым

высокометастатическим штаммом (0,05 мкг ДНК перед введением растворяли в 500 мкл свежей плазмы). Перед введением образец ДНК подвергали фотохимической дезинфекции (добавление 1 мкМ метиленового синего с последующим облучением красным светом в течение 10 минут (~60 000 Люкс).

Группа 4 – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двукратное (на седьмой и восьмой день после перевивки) введение суммарной фракции ДНК мышей с привитым высокометастатическим штаммом (0,05 мкг ДНК перед введением растворяли в 500 мкл свежей плазмы). Перед введением образец ДНК смешивали с 10 мкг анти-ДНК гидролизующих антител.

Группа 5 – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двукратное (на седьмой и восьмой день после перевивки) введение суммарной фракции ДНК мышей с привитым высокометастатическим штаммом (0,05 мкг ДНК перед введением растворяли в 500 мкл свежей гепаринизированной крови). Перед введением в образец добавляли 1 мкг фрагмента А растительного токсина Рицина и инкубировали 1 час при 37°C. Рицин является представителем семейства RIP (белки инактивирующие рибосомы) токсинов, широко используемых для создания иммунотоксинов. Кроме способности инактивировать рибосомы эти белки обладают способностью деаденилировать ДНК и осуществлять ее гидролиз. Для реализации токсического эффекта каталитическая единица А токсинов RIP II типа должна быть доставлена в клетку субъединицей В. В отсутствие субъединицы В цепь А не токсична, однако полинуклеотид-аденингликозидазная и ДНК-гидролазная активность цепи А может быть использована для разрушения ДНК, циркулирующей в плазме.

Группа 7 - 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двукратное (на седьмой и восьмой день после перевивки) введение суммарной фракции внеклеточной ДНК мышей, привитых низкометастатическим штаммом LLC.

Оценивали количество метастатических узлов в легких на 15 день после перевивки опухоли.

Результаты эксперимента приведены в таблице 7.

Таблица 7

Количество метастатических узлов (N ср.) в легких на 15 день после перевивки  
опухоли

N Группы	N ср.
1	12,0
2	22,5
3	14,1
4	15,5
5	15,1
7	13,3

- 5 Таким образом, различные способы разрушения внеклеточной ДНК крови подавляют ее патогенные свойства

#### Промышленная применимость

- 10 Для реализации данного способа применены известные материалы и оборудование, изготовляемое в заводских условиях, что обуславливает соответствие изобретения критерию «промышленная применимость». (IA)



## Формула изобретения

1. Способ лечения заболеваний, сопровождающихся изменениями  
качественного и/или количественного состава внеклеточной ДНК крови, а  
5 именно, генерализованных инфекционных заболеваний, вызываемых  
бактериями, заболеваний, вызываемых грибами и простейшими, атеросклероза,  
сахарного диабета, аллергических заболеваний, связанных с реакцией  
гиперчувствительности замедленного типа, заболеваний, обусловленных  
мутациями генов соматических клеток, характеризующийся тем,  
10 что в системную циркуляцию крови вводят агент, разрушающий внеклеточную  
ДНК крови.

2. Способ по п.1, характеризующийся тем, что в системную  
циркуляцию крови вводят фермент ДНКазу.

3. Способ по п.2, характеризующийся тем, что фермент  
15 ДНКазу вводят в дозах, обеспечивающих изменение электрофоретического  
профиля внеклеточной ДНК крови, выявляемое пульс-гельэлектрофорезом.

4. Способ по п.2, характеризующийся тем, что фермент  
ДНКазу вводят в дозах и режимах, обеспечивающих уровень ДНК-  
гидролитической активности плазмы крови, измеряемый в плазме крови и  
20 превышающий 150 единиц Кунца на литр плазмы, на протяжении суммарно  
более 12 часов в сутки.